

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՀԱԿՈՔՅԱՆ ԱՍՏՂԻԿ ՎԱՐԴԱՆԻ

ԽՈՂԵՐԻ ԱՐՅԱՆ ՄԱԿԱՐԴՄԱՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳԻ ԱԽՏԱԲԱՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՈՒՐ
ԱՖՐԻԿԱՎԱՆ ԺԱՆՏԱԽՏԻ ՎԱՐԱԿԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Գ.00.03 – «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանություն»
մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների թեկանծովի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախնետությամբ

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ-2017

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

АКОБЯН АСТХИК ВАРДАНОВНА

ПАТОЛОГИЯ СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ ПРИ ОСТРОЙ ФОРМЕ АФРИКАНСКОЙ
ЧУМЫ СВИНЕЙ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности
03.00.03 - «Молекулярная и клеточная биология»

ЕРЕВАН-2017

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝	Կենս. գիտ. դոկտոր Զ.Ա. Կարալյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	Կենս. գիտ. դոկտոր Կ.Բ. Նազարյան
	Կենս. գիտ. թեկնածու Է. Ա. Առաքելովա
Առաջատար կազմակերպություն՝	Հայ-ռուսական Սլավոնական Համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2017թ. հունիսի 30-ին, ժամը
14:00-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, Կենսաքիմիայի
042 մասնագիտական խորհրդում (ՀՀ, 0014, Երևան, Հասրաթյան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտի գրադարանում և <http://molbiol.sci.am> կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2017թ. մայիսի 29-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար
Կենս. գիտ. թեկնածու



Գ.Մ. Մկրտչյան

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института молекулярной
биологии НАН РА.

Научный руководитель:	доктор биол. наук Каралян З.А.
Официальные оппоненты:	доктор биол. наук Назарян К.Б.
	кандидат биол. наук Аракелова Э.А.
Ведущая организация:	Российско-Армянский (Славянский) Университет

Защита диссертации состоится 30 июня 2017г. в 14:00 часов на заседании
специализированного совета 042 по Биохимии, в Институте молекулярной биологии НАН
РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии
НАН РА и на сайте <http://molbiol.sci.am>.

Автореферат разослан 29 мая 2017г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,
кандидат биол. наук



Մկրտչյան Գ.Մ.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ. Первые исследования костного мозга (КМ) при АЧС начались еще в начале XX века однако серьезные клинические исследования были осуществлены лишь в 90х годах XX века в Европе (Gómez-Villamandos J. et al, 1997). Путем выдувания костного мозга из кости зараженного животного и последующего лизирования костного мозга исследовались количественные изменения клеток костного мозга и особенности репликации вируса в зараженной клетке. Исследования клеток системы свертывания крови (ССК) в костном мозге и в периферической крови, а также отклонений показателей факторов свертывания проводились с начала 1980х (Edwards J et al, 1984). Тем не менее, результаты данных работ противоречивы и комплексного исследования нарушений системы гемостаза не проделано. Так, например, одни авторы показали некроз мегакариоцитов, как основную причину развивающейся тромбоцитопении (Rodríguez F. et al, 1996a.; Rodríguez F. et al, 1996b.), в то время как другие авторы утверждают, что поражение мегакариоцитов незначительно и обнаруживается на последние сутки заболевания и, следовательно, не может быть причиной тромбоцитопении (Perez J.et, al 1997). Однако, ни одним из авторов при АЧС до сих пор не изучен фактор, регулирующий созревание мегакариоцитов и образование тромбоцитов- тромбопоэтин (ТПО). Результаты исследований факторов свертывания крови при АЧС различными авторами не выявили особых противоречий и показали удлинение времени коагуляции по всем параметрам (Edwards J. et al, 1984.), однако некоторые показатели системы свертывания не изучены вообще. Например, при изучении фибринолитической системы не были исследованы показатели количества D-димеров, которые являются основными показателями лизиса тромбов. Необходимо отметить, что комплексного исследования всей ССК, как клеточных, так и растворимых компонентов в динамике острой АЧС, вызванной 2-ым генотипом, вовсе не проводилось.

В связи со всем вышесказанным нами предложено исследовать весь пул клеток ССК в КМ и в периферической крови, динамику их количественных и качественных изменений в течение заболевания, а также изменения показателей регулятора созревания мегакариоцитов и образования тромбоцитов ТПО, и показателей факторов свертывания и анализ полученных данных.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ. Целью работы является изучение патогенеза клеток ССК в КМ и периферической крови при острой АЧС, вызванный 2-ым генотипом, в условиях *in vivo* и изменение показателей факторов свертывания крови в динамике заболевания.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Изучение популяционных показателей клеток ССК в КМ в при острой АЧС в условиях *in vivo* в динамике заболевания.
2. Изучение морфометрических показателей клеток и форменных элементов крови (кровяных пластинок) ССК в периферической крови *in vivo* в норме и при острой инфекции вирусом АЧС.
3. Исследование изменений показателей фактров свертывания крови в динамике заболевания.
4. Изучение ТПО в динамике АЧС, как важнейшего регулятора созревания мегакариоцитов и образования тромбоцитов.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА. Нами показано, что тромбоцитопения при острой форме АЧС вызванной 2-ым генотипом, является не непосредственно вирус-индуцированной, а ответной реакцией организма на вирус. Появление гигантских тромбоцитов а так же появление гиперплоидных форм клеток-предшественников тромбоцитов в КМ, свидетельствуют об усиленной пролиферацию мегакариоцитов для восполнения количества

тромбоцитов в периферической крови. Об этом так же свидетельствует колебание уровня ТПО в динамике заболевания, совпадающее с выявленными гигантскими и очень маленькими тромбоцитами. В ходе заболевания изменения показателей системы свертывания крови позволили заключить, что патология данной системы характеризуется синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС). Данное заключение подтверждает гипотезу о развитии синдрома системного иммунного ответа в ходе острой АЧС.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ. В связи с отсутствием методов предупреждения и лечения АЧС, изучение ключевых аспектов патогенеза заболевания является крайне важной задачей. Предполагается, что путем воздействия на эти аспекты возможно остановить или контролировать течение заболевания. Данное системное исследование нарушения гемостаза при АЧС, вызванное 2-ым генотипом, выявило ключевые аспекты патогенеза ССК в динамике заболевания, которые в дальнейшем могут служить мишенями для лечения и контроля данного заболевания. Эти исследования уточняют как патологию системы свертывания крови при АЧС так и патологию заболевания в целом.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Основные результаты настоящей работы были представлены и обсуждены на конференции молодых ученых “New Trends In Life Sciences” (Армения, 2016), семинарах и заседаниях ученого совета Института молекулярной биологии НАН РА (2013-2017).

ПУБЛИКАЦИИ. Основное содержание диссертации отражено в 5 научных публикациях.

СТРУКТУРА И ОБЪЁМ ДИССЕРТАЦИИ. Работа изложена на 104 страницах машинописного текста, содержит 1 таблицу и 32 рисунка, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, заключения и выводов. Список цитируемой литературы содержит 190 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данная работа, за исключением модели острой АЧС, выполнена в лаборатории вирусологии и клеточной биологии Института молекулярной биологии НАН РА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЖИВОТНЫЕ. Опыты проводились на 24 свинях породы ландрас, в возрасте от 3-х до 4-х месяцев, весом 25-30 кг, из которых 4 свиньи в контрольной группе и 24 свиней экспериментально зараженных АЧС. Все животные были клинически здоровыми в нулевой точке эксперимента. Животные содержались в отдельных стойлах, где им давали специальный корм два раза в день и доступ к воде в любое время суток.

ВИРУС. Для проведения экспериментов был использован вирус АЧС генотипа 2, распространенный на территории республики Армения с 2007 года. Вирус был выделен из селезенки и печени экспериментально зараженных свиней.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЛЕЙКОЦИТОВ И ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В МАКРОФАГИ. Для осаждения эритроцитов из периферической гепаринизированную кровь свиньи смешивают с 6% раствором декстрана в соотношении 1:5. Смесь в пробирке отстаивают 30-40 мин под углом 45° в термостате при температуре 37 °С до осаждения эритроцитов. Плазму, обогащенную лейкоцитами, отбирают, примесь эритроцитов лизируют. Выделенные клетки отмывают центрифугированием в растворе Хенкса при 1000 об/мин в течение 5 мин. Затем, планшет с 96 лунками засевают лейкоцитами и моноцитами (количество клеток 3.2×10^4 / лунка), выделенными из крови здоровой свиньи, для их дифференцировки в

макрофаг-подобные клетки. После 48 часов среда с не дифференцированными клетками удаляется и в лунках остаются макрофаг-подобные клетки.

ТИТРАЦИЯ ВИРУСА. Титрация вируса осуществлялась стандартным методом определения гемадсорбирующих единиц, так как было показано, что при наличии инфекции в лейкоцитах, на поверхности последних идет адсорбция красных кровяных клеток с образованием розет (Enjuanes L. et al, 1976).

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА. 4 свиньи были отделены в качестве контрольной группы и держались в условиях отсутствия контакта с вирусом. У остальных 24 свиней предварительно провели забор крови для собственного контроля (нулевая точка). Затем всем 20 животным внутримышечно ввели вирус в предварительно определенной дозе. С 1-го по 7-ой день эксперимента забор крови у инфицированных животных для различных исследований осуществлялся из глазной вены методом описанным ранее (Stier & Leucht, 1980).

ЭФТАНАЗИЯ. Эфтаназия свиней проводилась согласно протоколу Guidefor the Care and Use of laboratory Animals, AVMA Guidelines.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ КРОВИ И ИХ ОКРАСКА. Для приготовления мазков использовалась свежесобранная периферическая кровь из глазного венозного синуса свиней (Stier, Leucht, 1980) ежедневно в одно и то же время у здоровых и зараженных вирусом АЧС свиней.

Приготовление мазков крови осуществлялось стандартным методом (Houwen, 2002).

МОРФОМЕТРИЯ ТРОМБОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ТРОМБОЦИТОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В КОСТНОМ МОЗГЕ

Препараты крови и отпечатков костного мозга окрашенные по Гимза исследовались с использованием светового микроскопа (Houwen B., 2002; Ромейс Б., 1954). Исследование тромбоцитов проводилось согласно описанному методу (Malok M. et al, 2007).

ОКРАСКА ДНК ПО ФЕЛЬГЕНУ И ЦИТОФОТОМЕТРИЯ ДНК

Для цитохимических исследований зафиксированные на предметном стекле препараты отпечатков костного мозга окрашивались реактивом Шиффа по Фельгену (Ромейс Б., 1954).

ОКРАСКА РНК ГАЛЛОЦИАНИН-ХРОМОВЫМИ КВАСЦАМИ

Для окраски РНК в тромбоцитах галлоцианин-хромовыми квасцами (ГХК) использовали 98%+ галлоцианин фирмы (Aldrich). Для количественного анализа содержания РНК использовалась стандартная программа открытого доступа «ImageJ», а содержание РНК было выражено в условных единицах.

ИЗМЕРЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФАКТОРОВ КОАГУЛЯЦИИ КРОВИ

Все тесты коагуляции проводили с использованием плазмы, полученной из цитратной крови (3,8% цитрата натрия в качестве антикоагулянта в 9:1 объемном соотношении) центрифугированием при 1500xg, в течение 10 мин. при комнатной температуре. Плазму хранили в аликвотах при температуре -70оС и оттаивали непосредственно перед каждым экспериментом. Исследования проводились с помощью коагулометра Start 4 (Stago, France).

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Принцип метода АЧТВ состоит в определении времени свертывания декальцинированной плазмы после добавления к ней каолин-кефалин-кальциевой смеси. Эта смесь осуществляет активацию факторов XII, V и VIII гемокоагуляции. Таким образом, АЧТВ оценивает способность формировать фибрин посредством последовательного взаимодействия всех факторов XII, XI, IX, VIII, X, V, II, I.

Протромбиновое время (ПВ). В основе измерения протромбинового времени лежит определение времени формирования фибринового сгустка в исследуемой плазме после добавления к ней тромбопластин-кальциевой смеси. Эта смесь активирует фактор VII и обеспечивает функционирование внешнего каскада формирования фибрина. Так же, как и АЧТВ, исследование проводится с помощью коагулометра Start 4.

Тромбиновое время (ТВ). Данный тест отражает взаимодействие тромбина с фибриногеном - конечный этап свертывания крови. При добавлении тромбина к исследуемой плазме измеряется время от момента добавления реагента до образования сгустка.

D-димеры, определялись использованием метода твердофазного иммуноферментного анализа с помощью набора D-Dimer (D2D) ELISA Kit (Product No. ABIN368466). Все тесты сделаны строго согласно указаниям производителя.

Антитромбин III. Метод определения активности АТIII основан на способности АТIII нейтрализовать тромбин в присутствии гепарина. Активность АТIII определяют в плазме, добавляя к ней избыток тромбина. При этом происходит ингибирование тромбина комплексом АТIII-гепарин пропорционально количеству АТIII в плазме. Оставшееся количество тромбина катализирует отщепление пара-нитроанилина (pNA) от синтетического хромогенного субстрата. Абсорбция свободного pNA, определяемая при 405 нм, обратно пропорциональна активности АТIII.

Фибриноген. Измерение уровня фибриногена проводилось при помощи коммерчески доступного набора Porcine FBG (Fibrinogen) ELISA Kit (E-EL-P0017) от компании Elabscience Biotechnology Co., Ltd. методом твердофазного иммуноферментного анализа, и проводилось согласно указаниям производителя.

Измерение уровня тромбозина. Плазма для определения уровня тромбозина у экспериментальных животных, получена из крови без антикоагулянтов центрифугированием при 1500xg, в течение 10 мин. при комнатной температуре. Плазму хранили в аликвотах при температуре -70oC и оттаивали непосредственно перед каждым экспериментом. Измерения проводились с использованием коммерчески доступного набора для определения уровня тромбозина свиней (Catalog No: E-EL-P1759 48T; Elabscience Biotechnology Co.,LTD, WuHan, Hubei Province) методом твердофазного иммуноферментного анализа, и проводилось согласно указаниям производителя.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА

Все полученные экспериментальные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ для статистической обработки "Excel" версия 13.0 с использованием раздела программы "Анализ данных", подраздела "Описательная статистика". В каждой группе для всех признаков вычисляли среднее арифметическое, стандартное отклонение и среднюю ошибку среднего арифметического. Достоверность различий между средними значениями определяли по статистическому критерию t-Student. При непараметрическом распределении признаков использовался критерий Вилкоксона-Манна-Уитни с помощью программы SPSS 17.0 (SPSS, INC., Chicago, IL) и статистической программе GRAFPAD 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ И КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ

Для инициации эксперимента животные заражались внутримышечным (в/м) введением вируса с одинаковой дозой, определяемой гемадсорбционным методом. Для в/м инфицирования характерно раннее выявление вируса в крови и укорочение латентного периода заболевания на 2-4 дня (Guinat C. et al, 2014). Течение заболевания в нашем

эксперименте не отличалось от хода инфекции в ранее описанных работах, агональная стадия достигалась на 7-8 сутки после инфицирования (Gomez-Villamandos J. et al, 1997a). Первые сутки после заражения протекали практически бессимптомно, несмотря на вирусную, наблюдаемую с 2-ого дни (до Ig 4-5 ГАЕ/мл). Затем, начиная с 3-4 дни наблюдалась потеря аппетита и гипертермия, а после подъема температуры наружных покровов тела до 40-41⁰С, снижение активности, затруднение дыхания. На 5-6 дни у некоторых животных появилась кровь в фекалиях. Симптоматика нарастала, и на терминальной стадии (начало 7-ых суток) животные умерщвлялись согласно протоколу. Кожные геморрагии, наблюдаемые на 2-3 день, разных размеров 1-10мм в диаметре, локализованы в основном на внутренней части передних и задних конечностей, на кончиках ушей и были описаны и другими авторами (Anderson E. et al, 1987; McVicar J. et al, 1981). Описанные ранее (Wilkinson P. et al, 1980) девиации в поведении животных также наблюдались в нашем эксперименте - животные часто лежали в тени, дыхание учащенное, проявлялась выраженная вялость. Подытожив можно сказать, что клинические проявления заболевания в ходе нашего эксперимента не отличались от описанных ранее в литературе.

ПАТОЛОГИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ

Тромбоциты играют главную роль в системе свертывания крови и не только. При различных заболеваниях была показана вовлеченность тромбоцитов в процессы воспаления и иммунных ответов организма (Karen Y. et al, 2012; Stokes K. & Granger D., 2012). Нами так же были изучены изменения количественных и морфометрических показателей тромбоцитов и агрегированных тромбоцитов в динамике АЧС. В динамике заболевания происходит изменение тромбоцитов и агрегации тромбоцитов. Так напрмер по сравнению с контрольными животными у зараженных свиней на 2 дни обнаруживаются тромбоциты размерами меньше нормы. Вместе с этим на 3 дни у инфицированных свиней были обнаружены большие агрегации тромбоцитов не наблюдаемые у здоровых животных . Нами так же обнаружены агрегаты тромбоцитов включающих в себя тромбоциты как очень маленьких так и больших размеров а так же гигантские тромбоциты больше напоминающие осколки мегакариоцитов, площадью превышающие размеры эритроцитов.

У здоровых свиней размеры тромбоцитов колеблются от 9 до 11 μm^2 в среднем составляя около 300 клеток в мм^3 . В первый день заболевания (Рисунок 3-1) наблюдается значительное ($p<0.05$) увеличение количества тромбоцитов с 298.1×10^3 клеток в мм^3 на 510×10^3 клеток в мм^3 . Затем количество клеток снижается и на 3 день достигает 79.4×10^3 клеток в мм^3 ($p<0.05$). В последний день заболевания количество клеток стало приблизительно в 30 раз меньше контрольных значений и составило 10.9×10^3 клеток в мм^3 . Наряду со снижением количества тромбоцитов в динамике заболевания так же идет изменение размеров тромбоцитов. Так на 1 дни (Рисунок 3-2.) наблюдается уменьшение тромбоцитов с 11мкм^2 до 7мкм^2 ($p<0.05$). Данная тенденция сохраняется до 4 дни где размер тромбоцитов достигает минимальных значений и составляют 4мкм^2 ($p<0.05$) примерно в 3 раза меньше контрольных значений. На следующий день размеры тромбоцитов снова увеличиваются и уже составляют 6мкм^2 ($p<0.05$), данная тенденция сохраняется до последнего дни, однако, на последний день заболевания размеры тромбоцитов так и не достигают контрольных значений и составляют 6.9мкм^2 , что в 2 раза меньше контрольных показателей.

Количество и размеры агрегированных тромбоцитов в динамике заболевания приведены в Рисунке 3-3. и 3-4. Как видно, значительное повышение количества агрегированных тромбоцитов наблюдается с 1-го дня. Однако, в следующие дни количество агрегированных тромбоцитов в поле зрения уменьшалось и достигало минимального значения, в 40 раз меньше ($p<0.05$) контрольных значений. Интересным образом последние наблюдения совпадают и с размерами агрегатов (рисунок 3-4) , которые на 1-ый день почти в 10 раз ($p<0.05$) больше контрольных значений, однако на протяжении заболевания уменьшаются и

в последний день инфекции приближаются к контрольным. Интерес вызывает и тот факт, что количество тромбоцитов в агрегатах незначительно отличается от контрольных значений в динамике заболевания.

В данной главе также представлены данные по характеристике морфометрических показателей тромбоцитов в динамике АЧС. Морфометрические индексы тромбоцитов являются важным индикатором в выявлении ряда патологических и физиологических состояний у млекопитающих (Gresele P. & Clive P., 2002; van der Loo B. et al, 2005). Эти показатели служат основой для дифференциальной диагностики заболеваний свертывающей системы крови со схожей клинической картиной. У здоровых свиней, по данным литературы (Clemmons R. et al, 1983), размеры тромбоцитов обычно колеблются от 10 до 12 мкм². Наши данные (Zakaryan H. et al, 2014), показывают, что в норме размеры тромбоцитов составляют 11 мкм², а распределение тромбоцитов по площадям дает следующую картину приведенную в Рисунке 3-5. Как следует из рисунка у здоровых свиней распределение вариационного ряда нормальное с медиальным значением размеров тромбоцитов 11.1 ± 2.1 мкм².

С начала заболевания меняется распределение тромбоцитов по площадям, что заметно на 1-ый день. Наблюдается отклонение размеров тромбоцитов от нормы, проявляющееся уменьшением площадей тромбоцитов с медиальным значением 6.6 ± 1.7 мкм². Здесь же появляются большие тромбоциты с площадью 120 мкм², но преобладают тромбоциты (2-6%) с размерами меньше медиального значения ($2.1-4.1$ мкм²).

На 2-ой день инфекции заметна нормализация распределения тромбоцитов, однако медиальное значение меньше контрольных показателей (6.1 ± 1.6 мкм²), в вариационном ряде преобладают тромбоциты с площадью 4.9 и 5.2 мкм².

3-ий день характеризуется сохранением нормального распределения площадей и медиального значения размеров меньше нормы (7.0 ± 1.3 мкм²) и следовательно увеличение количества тромбоцитов размерами меньше медиального, а именно 3.6 мкм² (5%).

Интересны результаты измерений на 4-ый день где идет снижение медиального значения размеров тромбоцитов 4.0 ± 1.1 мкм² внутри распределения нормального вариационного ряда. При этом, на 4-ый день преобладают тромбоциты маленьких размеров 2 мкм², которые не наблюдались в контроле.

Ситуация меняется на 5 день когда распределение вариационного ряда отклонено от нормы с близким по сравнению с 3 днем медиальным значением размеров тромбоцитов 6.0 ± 1.3 мкм². Интерес представляет появление больших клеток достигающих размеров 30 мкм². Вслед за выявленными на 5 день большими тромбоцитами на 6 день появляются гигантские тромбоциты, не наблюдаемые у контрольных животных, размеры которых достигают 59.2 мкм². Однако распределение вариационного ряда отклонено от нормы, а медиальное значение размеров (7.3 ± 2.0 мкм²) не сильно отличается от предыдущего дня.

7 день, являющийся терминальной стадией заболевания характеризуется ненормальным распределением вариационного ряда с медиальным значением тромбоцитов 6.7 ± 1.9 мкм². В вариационном ряде по сравнению с нормой преобладают очень маленькие клетки размерами 2.6-2.8 мкм², исчезают гигантские клетки наблюдаемые за день до этого, однако, присутствуют большие тромбоциты размерами 17-21 мкм².

В этой главе представлены результаты исследований и изображающие морфометрические изменения тромбоцитов в динамике острой формы АЧС.

Данные по корреляции размеров тромбоцитов и их возрастом противоречивы. Некоторые авторы показали, что в норме тромбоциты размерами больше среднего значения являются молодыми клетками в популяции, а тромбоциты размерами больше средних значений являются старыми тромбоцитами (Hirsh J., 1972). Однако, обратное утверждают другие авторы (Craig B. et al, 1984) в работе которых показана независимость размеров и возраста клеток. В работе Зейглер и др (Zeigler Z. et al, 1978) было показано изменение количества и

размеров тромбоцитов при нарушениях различной этиологии в системе коагуляции. При экспериментальной тромбоцитопении вызванной описанными ранее методами (Krautman M., 1973) было показано, что появление больших тромбоцитов (в 2 раза больше нормы) связано с образованием макромегакариоцитов в костном мозге в ответ на острую тромбоцитопению. Данная гипотеза подтверждается тем фактом, что у экспериментальных животных время созревания мегакариоцитов укорачивается на 3 дня в ответ на тромбоцитопению. Возможно, в ответ на тромбоцитопению мегакариоциты выбрасывают большее количество фрагментов (компенсаторный механизм), чем в нормальном физиологическом состоянии.

Основываясь на данных приведенных выше, можно предположить что появившиеся с 4 дня большие и гигантские тромбоциты являются следствием включения компенсаторных механизмов в ответ на тромбоцитопению, наблюдаемую с первого дня заболевания. Более того, картина аналогична и в том, что после исчезновения гигантских тромбоцитов на 6 день большие тромбоциты все еще наблюдаются.

Вопрос об отсутствии больших и гигантских тромбоцитов у контрольной группы животных, и их появление в первые дни заболевания может объясняться способностью агрегировать в зависимости от размеров тромбоцитов, как было показано (Mathios E. et al, 2008) тромбоциты больших размеров чаще и больше агрегируют. Учитывая тот факт, что при АЧС вирусемия наблюдается уже через 20 часов после инфекции, и учитывая, что свертывающая система крови участвует также и в иммунных и воспалительных ответах организма в борьбе с вирусом, (Karen Y & Granger D, 2012; Huang H & Chang H, 2012), можно предположить, что большие и гигантские клетки участвуют в тромбообразовании наблюдаемой на 2 день.

Увеличение количества тромбоцитов, размерами меньше нормы, наблюдаемое с первого дня инфекции может свидетельствовать о задержке образования новых тромбоцитов в костном мозге на ранних стадиях заболевания или же утилизация молодых тромбоцитов в образовании микротромбов характерных для АЧС. Появление больших и гигантских тромбоцитов начиная с 4 дня заболевания может быть связано с нарушениями тромбоцитопоеза в костном мозге из-за наличия вируса в прогениторных клетках: мегакариоцитах. Однако в работах Эдвардс и др (Edwards J. et al, 1985) показано, что вирус в мегакариоцитах обнаруживается на последние дни заболевания (и следовательно не может являться причиной тромбоцитопении.)

ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА РНК ТРОМБОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ

Как было отмечено ранее количество РНК в тромбоцитах определяет уровень их зрелости и меняется при некоторых заболеваниях (Kienast J & Schmitz G., 1990).

Нами было исследовано изменение количества РНК в тромбоцитах в динамике заболевания. Как видно из Рисунка 1 сразу на 1-ый дни количество РНК достоверно снижается ($p < 0.05$), по сравнению с количеством в контрольной группе.

На 2-ой дни количество РНК возрастает, достигая контрольных значений. Начиная со 2 дни количество РНК возвращается к контрольным значениям. На 5 дни количество РНК снижается, однако нами определяется лишь тенденция ($p < 0.1$), по сравнению с контролем.

4-ый дни характеризуется достоверным ($p < 0.05$) снижением количества РНК по сравнению с контролем. На 6-ой дни количество РНК достоверно увеличилось по сравнению с 5-ым дни и недостоверно по сравнению с контрольными значениями, однако не достигает их.

Данные приведенные выше очень интересны при их сравнении со средними значениями размеров тромбоцитов в динамике заболевания, так как было выявлено совпадение выраженного снижения среднего значения РНК и достоверного снижения среднего значения размеров тромбоцитов на 1-ый дни. Такое же совпадение уменьшения количества РНК и среднего значения размеров тромбоцитов наблюдается на 4-ый и 5-ый дни.

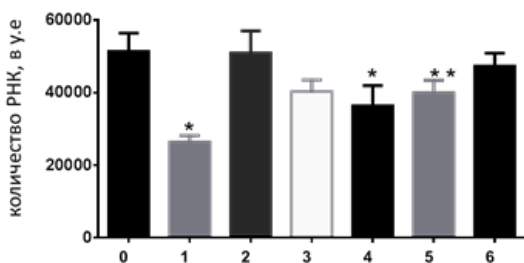


Рис. 1. Изменения количества РНК в тромбоцитах в динамике африканской чумы свиней.
На оси ординат: количество РНК в у.е., *на оси абсцисс* дни после инфекции; * - $p < 0.05$,
 ** - $p < 0.1$

Интересно так же и то, что изменение количества РНК на 6-ой дни и среднее значение размеров тромбоцитов на 6-ой дни стремятся, но не достигают контрольных значений. Таким образом, несмотря на отсутствие достоверных изменений, нами выявлены значимые колебания РНК в динамике заболевания в острой форм АЧС, что свидетельствует о частичном нарушении функциональной активности тромбоцитов. С учетом всего вышеизложенного, мы полагаем, что дальнейшие исследования патологии тромбоцитов могут, в будущем, дополнить нашу работу.

ПАТОЛОГИЯ МЕГАКАРИОЦИТОВ ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ

В данной главе нами впервые представлены данные об изменениях в популяции прогениторных клеток тромбоцитов, мегакариоцитов в норме и в динамике АЧС. Популяция морфологически определяемых предшественников тромбоцитопоэза в костном мозге здоровых свиней состоит из 4-х типов клеток: мегакариобластов, промегакариоцитов, базофильных и азурофильных мегакариоцитов. Определение типов клеток проводилось морфологическим путем, согласно (Harvey J., 2001). Мегакариобласты являются наиболее ранними морфологически определяемыми клетками тромбоцитопоэза. Размер мегакариобластов в диаметре около 30 μm , ядро в мегакариобластах свиней не исследовались на содержание ДНК, а у человека отличается низкой плоидностью (Tomer A. et al, 1988), с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, однородной структурой ядра и базофильной цитоплазмой без зернистости. Этот тип клеток обычно не выявляется в нормальных аспиратах костного мозга, так как присутствует в небольших количествах и трудно отличаются от других бластных клеток. Сравнительно легко дифференцируются следующие в процессе созревания - промегакариоциты. Они имеют несколько ядер и базофильную цитоплазму. Промегакариоцит отличается размерами около 45 μm . Ядро в промегакариоцитах свиней не исследовались на содержание ДНК, а у человека, по данным литературы (Kobayashi Y & Kondo M, 1999) отличается полиплоидией, крупным интенсивно окрашенным ядром, иногда зубчатым с тенденцией к полиморфизму. Структура ядра более грубая. Репликации в ядре промегакариоцитов приводит к образованию более крупного базофильного мегакариоцита, чьи ядра объединяются в лопастные массы. Затем образуется азурофильный мегакариоцит с широкой цитоплазмой или зрелый мегакариоцит. Основными отличиями базофильных и азурофильных мегакариоцитов являются окраска цитоплазмы и ядерно-цитоплазматическое соотношение. Процентное соотношение всех трех типов предшественников тромбоцитов в общей

популяции этих клеток у здоровых свиней составляет: 11% промегакариоцитов, 42% базофильных мегакариоцитов, и 47% азурофильных мегакариоцитов (таблица 1).

Мегакарициты свиней являются очень крупные клетки костного мозга, и их диаметр может достигать до 80-100 мкм. Ядра в мегакариоцитах свиней не исследовались на содержание ДНК, а у человека, (Tomer A. et al, 1988) отличаются полиплоидией (плоидность 16n и 32n и выше), плотным хроматином и многодольчатой формой. В цитоплазме мегакариоцита, по мере созревания, выявляются скопления азурофильной зернистости, чаще наблюдается отшнуровка пластинок.

Таблица 1.

Популяционные и цитометрические характеристики ядерных форм клеток тромбоцитопоэза в костном мозге здоровых свиней.

Клетки	Содержание в популяции (%)	Ядерно-цитоплазматическое соотношение
Промегакариоцит	11.0±2.3	0.60±0.3
Базофильный мегакариоцит	42.0±9.1	0.60±0.1
Азурофильный мегакариоцит	47.0±9.2	0.36±0.1*

достоверно ниже по сравнению с базофильными мегакариоцитами (-p<0.05)

Процентное соотношение всех типов мегакариоцитов резко меняется на 2-ой день, когда количество азурофильных мегакариоцитов снижается почти в 5 раз и составляет всего 10% от всей популяции. В это же время наблюдается противоположная картина у промегакариоцитов, их количество увеличивается в 5 раз и достигает 50% от всей популяции предшественников тромбоцитов. Базофильные мегакариоциты в количестве изменяются незначительно.

3-ий день заболевания характеризуется сокращением количества промегакариоцитов в 2 раза и увеличению количества базофильных и азурофильных клеток по сравнению с предыдущим днем. На 4-ый день количество промегакариоцитов снова повышается и сохраняет тенденцию к повышению до последнего дня заболевания. Изменения в количестве базо- и азурофильных клеток незначительны. 5-ий дни характеризуется сокращением количества прямых предшественников тромбоцитов в 2 раза (14%) по сравнению с предыдущим днем и в 3 раза по сравнению с контролем (совпадает с нашими данными по увеличению количества тромбоцитов в периферической крови на 5 день). Базофильные мегакариоциты приближаются к контрольным значениям. На 6-ой день количество промегакариоцитов и базофильных мегакариоцитов примерно одинаково и не сильно отличается от предыдущего дня, а количество азурофильных клеток увеличилось по сравнению с предыдущим днем, но все еще меньше контрольных значений. Интересно, что на 7 дни количество промегакариоцитов больше контрольных значений примерно в 5 раз как и на 2 дни, однако количество базофильных клеток уменьшилось в 2 раза по сравнению с 2 дни и контролем. Количество азурофильных клеток составило 33,85 % максимальное значение в динамике заболевания. Все описанное выше иллюстрировано на Рисунке 3-6.

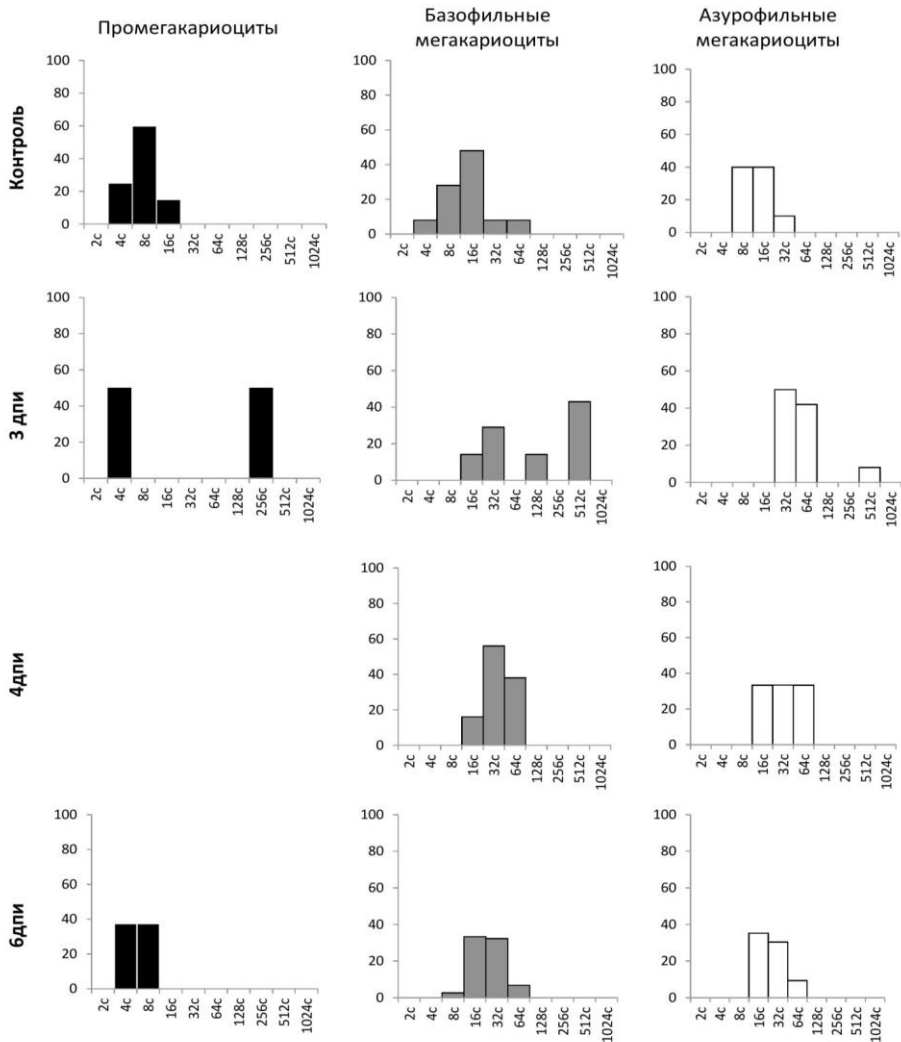


Рисунок 2. Распределение ядер клеток по классам пloidности в костном мозге здоровых свиней и свиней зараженных вирусом африканской чумы.
Ось абсцисс: содержание ДНК в единицах пloidности; *ось ординат:* частота встречаемости ядер в процентах (%).

Как видно из рисунка 2 у здоровых свиней от общего количества промегакариоцитов примерно 45% составляют клетки с плоидностью 8с, остальные клетки с плоидностью от 4 до 16с.

В популяции мегакариоцитов картина иная. У здоровых свиней в популяции базофильных мегакариоцитов наибольшее количество составляют клетки с плоидностью 16с (48%), однако значения плоидности варьируют от 4с до 64с.

При распределении ядер по классам плоидности азурофильных мегакариоцитов было выявлено, что в процентном соотношении равное количество клеток с плоидностью 8с и 16с, и 10% 32с клетки.

В динамике АЧС наблюдается смещение гистограммы у всех трех типов клеток. При исследовании плоидности промегакариоцитов на 3-ий дни было выявлено разделение этой популяции на две группы клеток с плоидностью 4с и 256с (иными словами на гиперполиплоидные и тетраплоидные). Последнее не наблюдалось в промегакариоцитах у здоровых свиней и в следующие дни заболевания.

В распределении ядер по классам плоидности у базофильных мегакариоцитов на 3-ий день наблюдается сдвиг гистограммы вправо со значениями 16с, 32с, 128с и 512с. Наибольшее количество составляют клетки с плоидностью 512с(45%). В популяции азурофильных мегакариоцитов наоборот на 3-ий день преобладают клетки с плоидностью 32с (50%) и 64с (42%), и всего 8% составляют клетки с плоидностью 512с.

На 4-ый день наблюдается полное отсутствие промегакариоцитов в костном мозге зараженных свиней. Гистограммы распределения ядер базофильных и азурофильных мегакариоцитов сдвинулись влево и представлены клетками с плоидностью 16с, 32с и 64с. Терминальная стадия заболевания (6-ой день) характеризуется сдвигом гистограммы влево. Значения плоидности у промегакариоцитов приближается к контрольным значениям, но не достигают их. Наибольшее количество составляют клетки с плоидностью 16с (50%), затем 32с (32%), и 64с (18%). Плоидность базофильных мегакариоцитов на 6-ой день достигает контрольных значений, однако распределение ядер не так разнообразно, наблюдаются клетки только с плоидностью 4с (50%) и 8с (50%). Азурофильные мегакариоциты с плоидностью 16с и 32с преобладают на 6-ой день и в малом количестве наблюдаются клетки с плоидностью 8с (5%) и 64с (10%).

Анализ данных по содержанию ДНК показывает, что во всех популяциях прогениторных клеток тромбоцитов на начальном этапе заболевания АЧС (3-ий день включительно) наблюдается сдвиг гистограммы вправо. У промегакариоцитов сдвиг гистограммы с максимальным значением плоидности наблюдается на 3-ий день (256с), однако сразу на следующий день (4-ый день) отмечено исчезновение клеток данной популяции. В популяциях базофильных и азурофильных мегакариоцитов наблюдается сходная картина сдвига гистограммы. На 3-ий день наблюдается резкий сдвиг гистограммы и достижение максимальных значений плоидности 512с. На следующий день в обеих популяциях наблюдаются клетки с одинаковыми значениями плоидности, и лишь на последний день заболевания, азурофильные мегакариоциты представлены более разнообразными фенотипами, однако в обоих случаях наблюдается тенденция к возвращению к начальным значениям.

Как известно (Levine R. et al, 1982) плоидность мегакариоцитов и их зрелость непосредственно связаны друг с другом. Также ранее было показано, что при экспериментальных тромбоцитопениях идет акселерация этапов созревания мегакариоцитов и увеличение плоидности клеток. Наши данные по изменению плоидности предшественников тромбоцитов совпадают с изменениями количества и размеров тромбоцитов в периферической крови в динамике АЧС.

Обобщая полученные данные можно сказать, что в ходе инфекции у промегакариоцитов идет сдвиг гистограммы распределения ядер по плоидности вправо начиная с 3дня, однако в

последний день заболевания замечается возвращение гистограммы к контрольным значениям. У базофильных мегакариоцитов по сравнению с промегакариоцитами и контрольными значениями наблюдается более выраженный сдвиг гистограммы вправо, однако с 4-го дня гистограмма начинает сдвигаться влево. В последний день заболевания плоидность клеток меньше, чем в контроле. Азурофильные мегакариоциты также показывают смещение гистограммы вправо, а на 6-ой дни гистограмма соответствует контрольным значениям. Выше описанное позволяет предположить, что скорее всего данные изменения носят компенсаторный характер и направлены на усиленную пролиферацию мегакариоцитов для восполнения количества тромбоцитов в периферической крови.

Нами также исследовано изменение количества общей популяции клеток предшественников тромбоцитов в динамике заболевания. По сравнению с контрольными значениями на протяжении заболевания встречаемость мегакариоцитов снижается (тенденция) на 1-ый дни в среднем до 2-х клеток, затем возрастает на 3дпи и снова снижается достигая минимальных значений на 4-ый дни составляя около 1.875 клеток. Затем количество клеток начинает расти, однако не достигает контрольных значений.

НАРУШЕНИЯ ГЕМОСТАЗА В ДИНАМИКЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ

Факторы коагуляции играют важную роль не только в гемостазе, но и тромбогенезе. Коагуляция является совокупностью протеолитических реакций факторов свертывания. Отличают внешний путь коагуляции, зависящий от тканевого фактора, и иницирующий реакции свертывания и внутренний путь свертывания крови, который, амплифицирует реакции каскада свертывания приводящие к агрегации тромбоцитов. Повышение уровня факторов коагуляции повышает риск тромбообразования (Rinsho N. et al, 2014). В динамике АЧС факторы свертывания крови были изучены несколькими авторами (Edwards J. et al, 1984; Blome S. et al, 2013). Изменение показателей факторов свертывания крови в динамике острой формы АЧС вызванной 2-ым генотипом изучены нами впервые.

Протромбин или коагуляционный фактор II участвует в конечной стадии коагуляции крови. Это витамин К-зависимый гликопротеин, который относится к альфа2-глобулинам, синтезируется в клетках печени и секретируется в кровь. При коагуляции крови протромбин (неактивная форма) превращается в тромбин (сериновая протеаза) путем протеолиза факторами Ха и Va, в присутствии ионов кальция и фосфолипидов. Далее, образовавшийся тромбин превращает фибриноген в нерастворимые сгустки фибрина (http://medbiol.ru/medbiol/blood_dis/00117247.htm).

Несмотря на то, что в нашей работе, колебания для средних значений протромбинового времени (ПВ), протромбинового соотношения и международного нормализованного отношения было выявлено, никаких достоверных изменений не было обнаружено для этих параметров.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) отражает состояние внутреннего пути свертывания и уровень фактора XII, фактора XI, фактора IX, фактора VIII, и других.

При нарушениях общего пути свертывания (начиная от активации фактора X) изменяются оба показателя АЧТВ и ПВ. Удлинение АЧТВ (Рисунок 4-1) и ПВ, рефрактерное к добавлению нормальной плазмы, говорит о наличии ингибиторов свертывания. (<http://humbio.ru/humbio/har/000b0a0f.htm>). В наших исследованиях наблюдалась выраженная тенденция к сокращению АЧТВ ($p < 0,1$ на 3-6 день) в течение эксперимента.

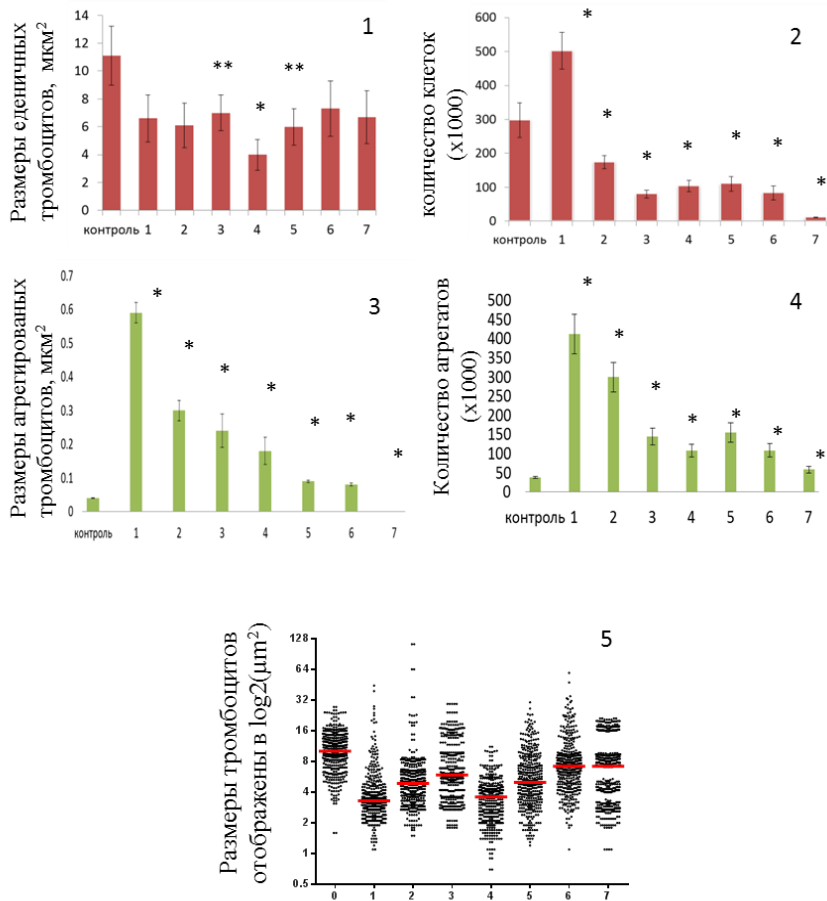


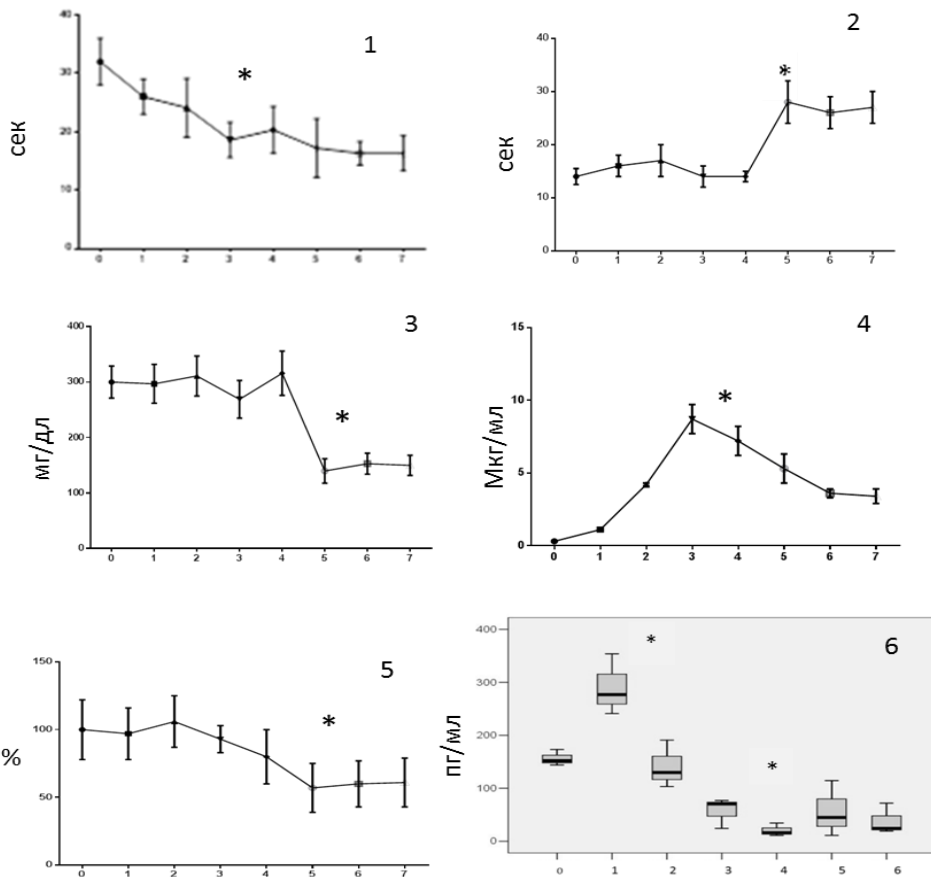
Рисунок 3. Тромбоциты в динамике АЧС.

1-2. Размеры и количество тромбоцитов в динамике АЧС.

3-4. Размеры и количество агрегированных тромбоцитов в динамике АЧС.

5. Распределение размеров тромбоцитов в динамике АЧС.

Во всех графиках на оси абсцисс указаны дни после инфекции. * - $p < 0.05$. ($M \pm SD$)



Риснок 4. Факторы коагуляции и ТПО в динамике АЧС.

- 1-Изменение Активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ).
- 2-Изменение тромбинового времени (ТВ).
- 3-Изминение количества Фибриногена (Фактор I)
- 4- Изменение количества D-димеров.
- 5- Изменение активности Антитромбина III.
- 6- Именение уровня ТПО в периферической крови.

Во всех графиках на оси абсцисс указаны дни после инфекции. *- $p < 0.05$. ($M \pm SD$)

Тромбиновое время (ТВ) - это период последнего этапа свертывания крови, когда происходит превращение фибриногена в фибрин в цитратной плазме после добавления в неё тромбина и кальция. ТВ зависит от уровня фибриногена в крови: снижение уровня фибриногена увеличивает тромбиновое время, поэтому анализ последнего обычно совмещают с анализом фибриногена и других показателей коагулограммы (<http://profnauka.ru>). В ходе инфекции ТВ не отличалось у контрольных и инфицированных животных, до 5-го дни (Рисунок 4-2), когда наблюдалось значительное и резкое продление ($p < 0.05$).

Уровень фибриногена показал небольшое увеличение и незначительное повышение на 4 день (316 мг/дл) и значительное, достоверное ($p < 0.05$) снижение в последующий период, вплоть до конца инфекции (Рисунок 4-3).

Антитромбин III — белок свертывающей системы крови, препятствующий свертыванию крови. Антитромбин контролирует свертывающую систему, обеспечивает нормальное свертывание крови и препятствует тромбообразованию в кровотоке (http://profnauka.ru/about.php?id=200&url=%2Fcatalog%2F%3Fcat_id%3D132) D-димер-продукт образующийся в результате распада тромба, состоящий из двух идентичных доменов. Наличие D-димеров в плазме указывает на полное разрушение сгустка. (<http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=24476>). В нашем эксперименте уровень D-димеров выше, чем в контроле, и достигает пика на 3-ий день (8,7 мг / мл) после чего уровень начинает снижаться (Рисунок 4-4), однако вплоть до конца заболевания его уровень остается достоверно выше контрольных значений ($p < 0.01$ - $p < 0.05$).

Активность антитромбина III (Рисунок 4-5) демонстрировала незначительную тенденцию к снижению по сравнению со здоровыми свиньями только на 5-6 день ($p < 0,1$).

Таким образом, нами показано нарушение системы свертывания крови у свиней зараженных 2-ым генотипом вируса африканской чумы свиней. Нарушение свертываемости крови проявлялось в удлинении ТВ и снижении уровня фибриногена, увеличении количества D-димеров и удлинении АЧТВ, а так же снижением активности антитромбина III на последних днях заболевания.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ТПО В ДИНАМИКЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Тромбопоэтин (ТПО) является важнейшим регулятором процесса созревания и дифференцировки мегакариоцитов и образования тромбоцитов (Kaushansky K. et al, 1994). Было показано, что различные концентрации ТПО по-разному влияют на тромбоциты, так, например, при сверх физиологических концентрациях ТПО > 100 нг/мл идет агрегация тромбоцитов в условиях *in vivo* (Hitchcock I & Kaushansky K, 2014) тогда как физиологические концентрации ТПО способствуют реактивности тромбоцитов с другими агонистами (van Willigen G. et al, 2000). Низкие концентрации ТПО (0.01-1 нг/мл) способствуют ускоренной адгезии тромбоцитов на фактор фон Виллебранда и без возможности отсоединения, что указывает на то, что ТПО может играть важную роль в образовании тромбов (van Os E. et al, 2003). В связи со всем этим, а так же на основе полученных данных о количественных изменениях в популяции предшественников тромбоцитов и их плоидности нами были исследованы количественные изменения ТПО в динамике заболевания АЧС.

Полученные данные (Рисунок 4-6) указывают на то, что на 2-ой день происходит резкое достоверное ($p < 0.05$) повышение количества ТПО в периферической крови у больных животных. 3-ий день характеризуется снижением количества ТПО по сравнению с предыдущим днем. На 4-ый день значение количества ТПО достигает минимального значения в ходе заболевания и составляет примерно 20 пг/мл. Необходимо отметить, что после резкого скачка на 2 день и резкого снижения на 4 день, показатели ТПО не достигают нормальных значений до последнего дня заболевания.

ВЫВОДЫ

1. В динамике острой АЧС, вызванной генотипом II, после кратковременного повышения количества тромбоцитов на начальном этапе заболевания, возникает выраженная тромбоцитопения, продолжающаяся до конца заболевания. Одновременно с тромбоцитопенией наблюдается появление гигантских тромбоцитов и внутрисосудистая адгезия тромбоцитов.
2. В динамике острой АЧС, вызванной генотипом 2 на начальном этапе было показано достоверное повышение сывороточных уровней тромбопоэтина на 1 день, что объясняет кратковременное повышение количества тромбоцитов.
3. В динамике острой АЧС, вызванной генотипом 2 уровень D-димеров в крови повышается на пике заболевания (3-4 дни), что свидетельствует об активации тромболиза на данном этапе.
4. В динамике острой АЧС, вызванной генотипом 2, во всех трех популяциях мегакариоцитов (промегакариоциты, базофильные и азурофильные мегакарициты) идет сдвиг гистограммы распределения ядер по плоидности вправо. Данные изменения носят компенсаторный характер и направлены на усиленную пролиферацию мегакариоцитов для восполнения количества тромбоцитов в периферической крови.
5. В динамике острой АЧС, вызванной генотипом 2, терминальная стадия заболевания характеризуется удлинением тромбинового времени, снижением уровня фибриногена, удлинением АЧТВ. Активность Антитромбина III также незначительно понижалась.
6. Выявленные нарушения в динамике острой АЧС, вызванной генотипом II, указывают на развитие синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС), что характерно при развитии ряда заболеваний с системными нарушениями иммунитета, в частности для синдрома системного иммунного ответа.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Karalova E., Zakaryan H., Voskanyan H., Arzumanyan H., Hakobyan A., Nersisyan N., Saroyan D., Karalyan N., Tatoryan M., Akopian J., Gazaryantz M., Mkrтчyаn Z., Pogosyan L., Nersesova L., Karalyan Z. Clinical and post-mortem investigations of genotype II induced African swine fever. // Porcine Research. 2015; 5(1):1-11.
2. Акопян А.В., Байрамян Н.В., Тусузян А.Т., Семерджян З.Б. Морфология и цитофотометрия клеток тромбопоэза у свиней. // Кровь. 2015; 1(19):54-59.
3. Zakaryan H., Karalova E., Voskanyan H., Ter-Pogossyan Z., Nersisyan N., Hakobyan A., Saroyan D., Karalyan Z. Evaluation of hemostaseological status of pigs experimentally infected with African swine fever virus. // Veterinary microbiology. 2014; 174:223-228.
4. Акопян А. В. Коагулопатия при острой форме Африканской чумы свиней. // Фарма; 2014; 9:60-63.
5. Каралова Е.М., Арзуманян Г.А., Мирзоян А.Ф., Акопян А.В., Каралян З.А., Восканян Г.Е., Каралян Н.Ю. Патанатомическая характеристика острой формы африканской чумы свиней в эксперименте. // Ветеринарная медицина. 2013; 97:98-100.

ԱՍՏՂԻԿ ՎԱՐԴԱՆԻ ՀԱԿՈՐՅԱՆ

ԽՈՂԵՐԻ ԱՐՅԱՆ ՄԱԿԱՐԴՄԱՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳԻ ԱԽՏԱԲԱՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՈՒՐ ԱՖՐԻԿԱԿԱՆ ԺԱՆՏԱԽՏԻ ՎԱՐԱԿԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Առանցքային բառեր - Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտ (ԽԱԺ), արյան մակարդման համակարգ, թրոմբոցիտներ, մեգակարիոցիտներ, տարածուն ներանոթային արյան մակարդեյիության համախտանիշ:

Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտը վտանգավոր զոոնոտիկ հիվանդությունն է: Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի հարուցիչը ԴՆԹ պարունակող 175-215 նմ վիրուս է: Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի վիրուսը առաջ է բերում կենդանիների քանակի անկում: Այն հայտնաբերում են հիվանդ կենդանիների արյան, լիմֆայի, ներքին օրգանների, արտազատուկների և արտաթորանքների մեջ: Վիրուսը կայուն է չորացման, բարձր ջերմաստիճանի նկատմամբ, +60°C դիմանում է մոտ 10 րոպե: Խոզերի աֆրիկյան սուր ժանտախտով վարակվելու դեպքում կենդանիների հիվանդությունը 6-րդ կամ 7-րդ օրը ավարտվում է մահով: Հիվանդության գաղտնի շրջանը կախված է օրգանիզմ մտած վիրոնների քանակից, կենդանու վիճակից, հիվանդության ընթացքից: Վարակի հարուցման աղբյուր են հիվանդ կենդանիները և վարակակիրները: Հիվանդության հարուցիչը կարող է փոխանցվել հիվանդ կենդանիների արտաթորանքի, տրանսպորտային միջոցների, ուտելիքի, վարակված արոտավայրերի միջոցով: Վիրուսը կարող է փոխանցվել թռչունների, մարդկանց, ընտանի և վայրի կենդանիների, կրծողների միջոցով, եթե նրանք շփում են ունեցել հիվանդ կամ սատկած խոզերի հետ: Բնության մեջ վիրուսը կրում են վայրի խոզերը ինչպես նաև *Ornithodoros* ցեղի տզերը: Ներկայում ինֆեկցիայի կանխարգելման, բուժման մեթոդ և պատվաստանյութ չկա: Վիրուսը տարածված է Աֆրիկյան երկրներում, ինչպես նաև Կոբայում, Պորտուգալիայում, Իսպանիայում, Իտալիայում, Հայաստանում, Վրաստանում, Ռուսաստանում և այլ երկրներում: Հայաստանում և Վրաստանում վիրեմիայի առաջին բռնկումները գրանցվել են 2007թ.: Չնայած վիրուսի լայն տարածմանը ԽԱԺ-ի պաթոգենզը բավարար չափով ուսումնասիրված չէ: Այս կապակցությամբ կարևոր է ԽԱԺ-ի պաթոլոգիայի ուսումնասիրությունը, ինչը հետազայում կարող է հանգեցնել հակավիրուսային նոր միջոցների մշակմանը, որոնք կծառայեն ԽԱԺ-ի բուժմանը և պրոֆիլակտիկային: ԽԱԺ-ի ախտաբանության կարևոր տարրերից մեկը հեմոստազի խանգարումն է: մի շարք հեղինակներ ցույց են տվել, որ, հիվանդության սկզբնական շրջանում տեղի է ունենում մակարդման համակարգի ակտիվացում, ինչի արդյունքում, սկսում են առաջանալ թրոմբեր, որոնք բերում են

փոքր և միջին անոթների խցանման: Ապա, հիվանդության 3-4 օրերին, ակտիվանում է արյան հսկամակարդման համակարգը, ինչը, արդեն գոյություն ունեցող թրոմբերի ֆոնի վրա, արտահայտվում է զանգվածային արյունազեղումներով ինչպես մաշկի վրա, այնպես էլ ներքին օրգաններում (Villeda C.J et al, 1993b; Edwards, J.F et al, 1984): Հաշվի առնելով վերը նշվածը, կարելի է եզրակացնել, որ ԽԱԺ-ի II գենոտիպի ժամանակ հեմոստազի ախտաբանության ուսումնասիրությունը կարևոր է ԽԱԺ-ի ախտաբանության ընդհանուր պատկերի համար: Նորմալից փոքր չափսեր ունեցող թրոմբոցիտների քանակն ավելանում է սկսած վարակի առաջին օրվանից, ինչը կարող է վկայել ոսկրածուծում թրոմբոցիթների առաջացման գործընթացի խախտման մասին կամ նոր առաջացած թրոմբոցիտների ծայրամասային մազանոթներում թրոմբերի առաջացման գործընթացում ինտենսիվ ներգրավվելու մասին: Մեծ և հսկայական չափսերի թրոմբոցիտների հայտնաբերումն սկսած վարակի 4-րդ օրվանից, կարող է կապ ունենալ ոսկրածուծում թրոմբոցիտների առաջացման գործընթացի խախտման հետ և/կամ արագացված պրոլիֆերացիայի հետևանք, ի պատասխան թրոմբոցիտների քանակի նվազեցման: Գրականության մեջ նորմալից փոքր և մեծ չափսերի թրոմբոցիտների հայտնաբերումն, կապում են թրոմբոցիտոպենիաների հետ, երբ ոսկրածուծն չի հասցնում համալրել անհրաժեշտ թրոմբոցիտների քանակը և բաց է թողնում մեզակարիոցիտների հասունացման որոշ փուլերը: Ոսկրածուծում թրոմբոցիտների պրոգենիտոր բջիջների կորիզների ԴՆԹ-ի պլոիդության բաշխման ուսումնասիրումը, ցույց է տվել, որ տեղի է ունենում հիստոգրամի շեղում դեպի աջ, ինչը ոսկրածուծի կողմից ծայրամասում պակասող թրոմբոցիտների քանակի փոխհատուցմանն ուղղված արագացված պրոլիֆերացիայի հետևանք է: Սուր ԽԱԺ-ի դինամիկայում արյան մակարդման համակարգում երկարացել է թրոմբինի ժամանակը, նվազել է ֆիբրինոգենի քանակը արյան մեջ, D-դիմերների քանակն շատացել է և կարճացել է ակտիվացված մասնակի թրոմբոպլաստինի ժամանակը: Անտիթրոմբին III ակտիվությունը ևս նվազել է: Մնացած գործոնների ցուցանիշներում նշանակալի փոփոխություններ տեղի չեն ունեցել: ԽԱԺ-ի հետ կապված մենք առաջինն ենք ուսումնասիրել թրոմբոպոետինի ցուցանիշների փոփոխությունը, և հայտնաբերել, որ, վարակի առաջին օրը ցուցանիշներն կտրուկ աճում են, սակայն նվազում են 2-րդ օրը, հասնելով նվազագույն ցուցանիշի վարակի 4-րդ օրը: Այսպիսով, կատարված աշխատանքի արդյունքում հայտաբերված մի շարք շեղումներ, թույլ են տալիս ենթադրել, որ սուր ԽԱԺ-ի ժամանակ տեղի ունի տարածուն ներանոթային արյան մակարդելիության համախտանիշը: Այդ մասին են մասնավորապես խոսում մակարդիչ և հակամակարդիչ համակարգերի միարժամանակ աշխատանքը: Այս համախտանիշն, համաձայն գրականության տվյալների, հանդիսանում է համակարգային իմունային պատասխանի համախտանիշի բաղադրիչ մաս:

SWINE BLOOD COAGULATION SYSTEM PATHOLOGY DURING THE
INFECTION OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS

SUMMARY

Key words: African swine fever virus, blood coagulation system, platelet, megakaryocyte, disseminated intravascular coagulation syndrome.

African swine fever is a dangerous zoonotic disease. African swine fever is caused by a DNA virus with 175-215 kbp. African swine fever virus causes a decline in the number of animals. The virus is detected in lymph, in internal organs, fluids of infected animals. The virus is resistant to drying; the high temperature, + 60°C stand for about 10 minutes. In case of acute form of African swine fever on the 6th or 7th day animals died. The latent period of disease in organism depends on the amount of viruses, animal physiology and from the course of infection. The source of infection may be sick and infected animals. The virus can be transmitted by excreta, sick animals, vehicles, food, by infected grazings. The virus can be passed from birds, human, domestic and wild animals, and rodents, if they have had contact with sick or dead pigs. In nature, the virus carried by wild pigs as well as in ticks of *Ornithodoros* family. There are no vaccine for infection prevention, and no drugs for treatment. The virus is widespread in African countries, as well as Cuba, Portugal, Spain, Italy, Armenia, Georgia, Russia and other countries. Viraemia first outbreaks were registered in Armenia and Georgia in 2007.

Despite the wide spread of the virus its pathogenesis have not been studied sufficiently. In this regard, it is important to study the pathology of the ASF, which may lead to the development of new security measures that will be used in the treatment and prophylaxis of the ASF. Several authors have shown that the disease occurs in the initial stage of coagulation system activation, as a result, begin to emerge from blood clots that cause thrombosis of small and medium-sized vessels. Then, at the 3-4 days of illness, activated blood anticoagulation system, which is already existing thrombus in the background, as expressed in massive hemorrhages in the skin, internal organs. Taking of the above, we can conclude that study of pathology of hemostasis induced by ASFV-II genotype infection is important for the overall image of the ASF pathology.

Abnormally small size of platelets increases from the first day of the infection, which may indicate a breach of platelets occurrence of bone marrow or consumption of newly formed platelets in thrombus formation process in peripheral capillaries. Large and giant sizes platelets spotting from the 4th day of infection can be in connection with bone marrow platelet formation precesses violation and / or accelerated proliferation effect in response to the reduction in the number of platelets in peripheral blood. Abnormally small and large sizes platelet-discovery, usually is connected with thrombocytopenia when bone marrow does not manage to increase the number of platelets and skips certain stages of megakaryocytes maturation.

Study of platelet's progenitor cells nuclei DNA ploidity distribution has shown that there is a histogram deviation to the right, which is accelerated by the proliferation of bone marrow, for the compensation of platelet count. During the infection Thrombin time was elongated, reduced number of blood fibrinogen, amount of D- dimer increased, activated partial thromboplastin time is shortened, and Antitrombin III activity is decreased. There were no significant changes for other factors. We are the first to study the changes of thrombopoetin and found that during the infection, its amount is rising sharply on the first day, but decreases on the 2nd day to 4th day, where the minimum rate was observed. Thus, the workflow identified a number of anomalies suggest that acute disseminated intravascular coagulation syndrome has taken place in the ASF. This syndrome, according to literature data, is an important component of systemic immune response syndrome.